

CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DE *ESCHERICHIA COLI* ISOLADAS DE MANANCIAIS DA SERRA DA CANASTRA-MG QUE ABASTECEM QUEIJARIAS REPRESENTATIVAS DA REGIÃO

Júlia Silva Vieira de Souza (1); Gabriel Henrique Oliveira Silva (1)* ; Leôncio Diamante (1); Pedro William Maia (1); Gustavo Augusto Lacorte (1); Raphael Steinberg da Silva (1)

¹ Instituto Federal de Minas Gerais - *campus* Bambuí

RESUMO

A região da Serra da Canastra é conhecida por sua tradicional produção de Queijo Minas Artesanal e a linha de produção desse alimento é representada por várias propriedades rurais que utilizam das nascentes do rio São Francisco como fonte de abastecimento para o empreendimento. A utilização desses mananciais sem tratamento se evidencia como um grande potencial de contaminação fecal, oriunda de animais domésticos e silvestres tornando esses cursos de águas grandes reservatórios de enterobactérias, incluindo *Escherichia coli* responsável por uma variedade de doenças, principalmente infecções intestinais. As técnicas de identificação molecular são relevantes instrumentos para analisar a carga microbiana de alimentos, como o queijo Canastra, bem como, fornecer informações para o controle da sua produção. O presente estudo teve como objetivo geral caracterizar molecularmente a diversidade genética de isolados de *E. coli* obtidos a partir de amostras de água de 12 mananciais que abastecem propriedades rurais que produzem o Queijo Canastra. Foram obtidos 318 isolados e, utilizando a técnica molecular de DNA fingerprinting rep-PCR (GTG)₅ foram identificados 141 perfis genéticos de *E. coli*. O local de amostragem com o maior número de diferentes perfis genéticos foi o rio 08, enquanto que o rio 06 representou o ponto de amostragem com a menor riqueza de perfis genéticos. Os resultados encontrados evidenciaram que os diferentes pontos amostrais possuem diferentes isolados de *E. coli* e que, dependendo do Rio amostrado, a diversidade genética presente pode variar. Considerando que há diversidade genética nas populações de *E. coli*, é possível que exista também diferenças na capacidade destes isolados em apresentar genes de virulência e de resistência a antimicrobianos, parâmetros importantes para o monitoramento da qualidade da água para o abastecimento de propriedades envolvidas na produção do Queijo Canastra.

Palavras-chave: Água 1. Contaminação Microbiana 2. *Escherichia coli* 3.

1 INTRODUÇÃO

A região da Canastra é reconhecida por abrigar e servir como proteção a nascente histórica de uma das bacias hidrográficas mais relevantes no contexto econômico do país: a bacia do Rio São Francisco. Além disso, a região também é marcada por sua tradicional produção de queijo artesanal, cuja produção está inteiramente relacionada aos mananciais da cabeceira do rio São Francisco, posto que, os cursos de água que

atravessam as propriedades são fonte de água para as várias etapas de produção desse alimento (CASTRO et. al., 2016). Dessa forma, é comum em propriedades como estas o uso de ribeirões como bebedouros para o gado, muitas vezes não protegidas e conservadas, resultando em um alto nível de contaminação microbiológica da água (LUCAS et al., 2014). A baixa qualidade da água é consequência da contaminação de microrganismos potencialmente patogênicos que ocasionam numerosos casos de infecções intestinais nos animais e nos seres humanos, interferindo na vida útil dos equipamentos e diminuindo a qualidade do leite (GUERRA et. al., 2011). Sabe-se que, das enterobactérias contaminantes de alimentos, *E. coli* é uma das mais relevantes, por serem patogênicas, responsáveis por uma variedade de doenças, e por produzir toxinas que destroem o epitélio intestinal, causando diarreias.

A aplicação de técnicas moleculares na caracterização de *E. coli* se torna relevante para o conhecimento da diversidade e o potencial de cepas encontradas em águas que abastecem empreendimento produtor do Queijo Canastra. Os dados gerados a partir desse projeto evidenciam um panorama de riscos à população, estimando a qualidade da água e adotando medidas efetivas para o monitoramento e o controle das fontes de contaminação. Portanto, a proposta desse projeto foi caracterizar molecularmente a diversidade genética de *E. coli* em amostras de DNA genômico total extraídos de 318 isolados oriundos de mananciais da Serra da Canastra-MG que abastecem queijarias representativas da região.

2 METODOLOGIA OU MATERIAL E MÉTODO

Para a caracterização da diversidade genética, foram coletadas amostras de água de 12 rios em 12 pontos amostrais de mananciais localizados na cabeceira do Rio São Francisco, que abastecem propriedades rurais produtoras do Queijo Canastra. As coletas ocorreram entre os meses de julho e agosto de 2022, estação seca. A enumeração e o isolamento das bactérias foram feitos pelo método *spread plate* em meio ágar Chromocult, seletivo para Coliformes e *E. coli*, através de diluições seriadas em salina 0,85%, seguidas de incubação em estufa microbiológica, em aerobiose, durante 48 h, a 37 °C (My Labor + SS, Brasil). Os resultados foram expressos em unidades formadoras de colônia por mililitro de água (UFC/mL), e os plaqueamentos foram feitos em duplicata. Das

colônias obtidas em cada placa, foram selecionadas aquelas com diferentes morfologias com coloração azul marinho, presuntivas de *E. coli*, que foram isoladas pela técnica de estria de esgotamento e congeladas para posterior análise molecular. Após a reativação dos isolados em 5 mL de caldo *Ec. Medium*, foi extraído o DNA genômico, sendo posteriormente submetido a análises para medição da concentração e pureza por meio do emprego do equipamento NanoDrop TM OneC (ThermoScientific).

A técnica de rep-PCR (DNA *fingerprinting*) é uma ferramenta molecular prática e precisa, sendo muito utilizada para a caracterização da diversidade genética das populações de *E. coli*, para a identificação de padrões de repetição em seu material genético. Portanto, a diversidade genética foi avaliada por meio da análise visual e manual da técnica de rep-PCR (DNA *fingerprinting*) utilizando na amplificação o primer gerado (GTG)₅, realizada separadamente, sendo feito um gel para cada rio. As reações foram realizadas conforme Gever e colaboradores (2001), usando o iniciador GTG 5:5' GTG GTG GTG GTG GTG 3' e MasterMix 2x (Cellco), com adição de gelatina 0,01%. Após amplificação, os produtos de PCR foram resolvidos por meio de eletroforese em gel de agarose 2% corado com brometo de etídeo e os perfis foram observados por meio de exposição do gel à luz ultravioleta em um transluminador com fotodocumentador acoplado. Essa técnica foi utilizada para retirar os isolados que pertenceriam à mesma linhagem bacteriana, a fim de minimizar o número de indivíduos julgados clone.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Durante a etapa de isolamento em ágar Chromocult foram obtidos 318 isolados de presuntivos de *E. coli* nas amostras obtidas durante a estação seca. Foram consideradas colônias de *E. coli* aquelas que apresentavam coloração azul-marinho em crescimento no ágar Chromocult. O perfil de *fingerprint* rep-PCR (GTG)₅ foi obtido e analisado para cada um dos isolados, com o objetivo de identificar *E. coli* que pertenciam a uma mesma linhagem bacteriana.

Quadro 1 - Crescimento bacteriano; colônias de Coliformes e *Escherichia coli* crescidas em meio seletivo Chromocult.

RIO AMOSTRADO	NÚMERO DE PERFIS
RIO 1	14
RIO 2	19
RIO 3	08
RIO 4	04
RIO 5	15
RIO 6	03
RIO 7	Ainda em processamento
RIO 8	25
RIO 9	18
RIO 10	20
RIO 11	05
RIO 12	10

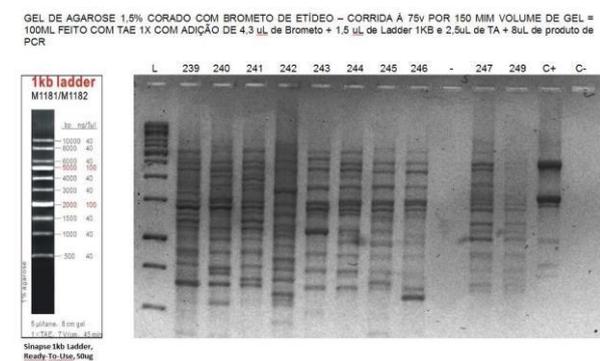
Por meio da análise visual do perfil de *fingerprinting rep-PCR* (GTG)₅, foram descartados 177 isolados que representavam um clone de outro isolado obtido no mesmo rio amostrado, permanecendo apenas um isolado de cada perfil por amostra de rio. Foram notificados 141 perfis genéticos de *E. coli*, destes, 25 são pertencentes ao rio 08, que obteve maior número de diferentes perfis. Já o rio 06, representou o ponto de amostragem com a menor riqueza, com 03 perfis genéticos.

A diversidade genética é distintiva para cada rio amostrado, e diferentes pontos amostrais possuem diferenciados isolados de *E. coli*. Portanto, evidencia-se que, há diversidade genética nas populações de *E. coli*, e é provável que seja encontrado também diferenças na capacidade destes isolados em manifestar genes de virulência e de resistência a antimicrobianos. Ademais, quanto maior diversidade genética existente entre as linhagens de *E. coli* identificadas, maior é a probabilidade e o potencial de cepas com diferentes perfis de virulência e resistência.

Como produto final, de cada representante dos perfis genéticos será estabelecido parâmetros de ocorrência de genes de virulência e resistência, essas identificações que servirão como estimativa de distribuição espacial dos pontos quentes dessas cepas, estimando de forma mais direta riscos à saúde humana.

Figura 2 - Perfis de *fingerprinting rep-PCR* (GTG)₅ de isolados de *E. coli* obtidos a partir da resolução de amplicons em eletroforese em gel de agarose 2% corado com brometo de etídeo e documentado em transluminador com luz UV Gel Doc XR (Bio-rad, Hercules, CA, EUA).

Gel GTG5 015 – Júlia 04-09-23 (taq)



4 CONCLUSÃO

A pesquisa é importante para o entendimento e conhecimento dos riscos à população local pelo consumo da água, assim como, da população geral, pelo consumo do Queijo Canastra. Além disso, pretende-se estimar maiores riscos à saúde humana, baseando-se em parâmetros de prevalência detectando o potencial de virulência e resistência das linhagens isoladas. Deseja-se traçar um mapa de distribuição dos perfis genéticos de *E. coli*, identificando pontos quentes com maior diversidade de cepas ou presença de focos de contaminação com linhagens potencialmente virulentas e resistentes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CASTRO, R. D., OLIVEIRA, F. M., SANT'ANNA, L. M. P., LUIZ, S. H. C., et al. Lactic acid microbiota identification in water, raw milk, endogenous starter culture, and fresh Minas artisanal cheese from the Campo das Vertentes region of Brazil during the dry and rainy seasons. *Journal of dairy science*, v. 99, n. 8, p. 6086-6096, 2016
- GUERRA, M. G.; GALVÃO JÚNIOR, J. G. B.; RANGEL, A. H. N.; ARAÚJO, V. M.; et al. Disponibilidade e qualidade da água na produção de leite. *Acta Veterinaria Brasilica*, v. 5, n. 3, p. 230-235, 2011
- LUCAS, A. S.; CARVALHO, C. M.; CRUZ, R. C.; BORBA, M. F. Diagnóstico do uso de nascentes como fonte de abastecimento de água pela pecuária familiar no território do Alto Camaquã, RS. In: Embrapa Pecuária Sul-Artigo em anais de congresso. In: Seminário Brasileiro de Gestão Ambiental na Agropecuária, 4., 2014, Bento Gonçalves. Anais... Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2014.